

# 第十七屆旺宏科學獎

## 成果報告書

參賽編號：SA17-319

作品名稱：以果蠅模式探討粒線體熱休克蛋白  
Hsp90 抵禦奈米銀毒性之機轉

姓名：魏竣瀚

關鍵字：奈米銀、果蠅、熱休克蛋白

# 目錄

目錄.....	ii
摘要.....	- 1 -
壹、研究動機.....	- 1 -
貳、研究目的.....	- 1 -
參、研究設備及器材.....	- 2 -
肆、研究過程或方法.....	- 4 -
伍、研究結果.....	- 11 -
陸、討論.....	- 14 -
柒、結論.....	- 16 -
捌、參考文獻及其他.....	- 17 -

## 摘要

奈米銀具優良的抗菌活性，市面上有越來越多標榜含奈米銀之產品。許多的細胞與動物實驗已指出奈米銀有潛在毒性，然而毒性的細胞與分子機轉仍需進一步釐清。近來的研究已發現粒線體是奈米銀進入細胞內攻擊標靶之一，然而粒線體本身也有維持其恆定性的機制，其中粒線體的伴護蛋白被認為是其自我保護的第一道防線。本研究將利用果蠅--這種已被很多科學文獻認為是探討奈米毒性分子機轉的優勢生物模式一來釐清粒線體的熱休克蛋白/伴護蛋白 Hsp90 是否具有保護生物個體來抵禦奈米銀毒性之功效，並利用這個模式來探討奈米銀誘發粒線體毒性之機轉。

## 壹、研究動機

奈米銀有抗菌活性，而透過奈米技術把銀奈米化後，讓其應用性更廣泛；根據 2015WWISC 奈米技術產品登入清單(Nanotechnology consumer products inventory, NCPI)的統計，全球有將近半數的奈米產品都含有奈米銀的成分(Vance et al., 2015)，而美國食藥署(FDA)也核准燒燙傷敷料添加奈米銀(Administration, 2018)。雖然目前並沒有危害人體健康的直接證據，但近年來許多體外(*in vitro*)與體內(*in vivo*)研究報告都指出，奈米銀對生物具有潛在危害性(Johnston et al., 2010)，但其細胞與分子層級的毒性機制仍須要進一步探討，以讓我們可針對其對人體的危害防範未然。奈米銀可藉由攝食、皮膚接觸、呼吸與注射等方式侵入人體(Mao, Tsai, Chen, Yan, & Wang, 2016)。奈米銀逐漸應用於食品包裝材料，所以透過飲食暴露到奈米銀的機會也隨之增高(Nowack, Krug, & Height, 2011)；另一方面，果蠅已被認為是探討奈米毒性分子機轉之優勢生物模式，所以我們的科展主題是利用果蠅且藉由飲食暴露的方式，來解析奈米銀對生物體的危害機轉，並希望能找出對抗奈米銀毒性之策略。細胞的粒線體已被認為是奈米銀的攻擊標靶之一(Mao, Chen, Wang, & Yan, 2018)，已知熱休克蛋白 Hsp90 (heat-shock protein 90)對粒線體的恆定性維持有著重要功能(Felts et al., 2000)，所以我們設計實驗以釐清此蛋白在生物體應對奈米銀毒性時能否提供保護效果。

## 貳、研究目的

粒線體為奈米銀可能攻擊之標靶，而熱休克蛋白 90 為保護粒線體的重要蛋白質，我們假設「提升此蛋白質之表達量有助於改善粒線體之功能，而讓生物體有較好的抗奈米銀毒性能力。」因此，我們透過以下實驗來驗證此假說。

- 一、探討奈米銀對果蠅粒線體結構、功能及數量的影響。
- 二、探討奈米銀對受暴露果蠅幼蟲之蠕動能力的影響。
- 三、測試 Hsp90 基因之同型合子突變體(homozygous null mutant)、異型合子突變體(heterozygous null mutant)與野生型(wild type, control group)果蠅對奈米銀易感受性之差異。
- 四、檢測受奈米銀暴露之 Hsp90 基因同型合子與異型合子之幼蟲蠕動能力跟對照組之間

的差異性。

五、檢測增加表達人類 Hsp90 表達量對果蠅對抗奈米銀毒性之效果。

六、檢測增加表達人類 Hsp90 表達量對減輕奈米銀對蠕動能力損害之效果。

### 參、研究設備及器材

#### 一、器材列表

CO2 麻醉組	解剖顯微鏡	培養箱	果蠅培養基	蘋果汁瓊脂培 養基	塑膠試管
					
集卵器	3.5%(w/v) agarose gel	方格紙	鋁箔紙	AgNPs 溶液	檸檬酸鈉
					
挑蟲針	離心瓶	螢光顯微鏡	水浴槽	微波爐	超音波震盪 器
					
蠕動幫浦	離心機	顯微鏡用攝影 機	加熱盤	天平	培養基之藥 品
					
硼氫化鈉	硝酸銀	20% 蔗糖水 溶液	EtOH	preservative A	preservative B
					

(-)

二、自製果蠅培養基添加之防腐劑(preservative) 配方:

preservative A		
苯甲酸苯甲脂	80	g
總體積(EtOH 為溶劑)	400	ml
preservative B		
丙酸	418	ml
85%磷酸水溶液	41.5	ml
總體積(MQ H <sub>2</sub> O)		ml

(表二)

三、果蠅培養基配方:

MQ H <sub>2</sub> O	1900	ml
BRL agar	20	g
Glucose	105	g
Black sugar	52.4	g
Yeast powder	120	g
cornmeal	90.9	g
Preservative A	20.2	ml
Preservative B	25	ml

(表三)

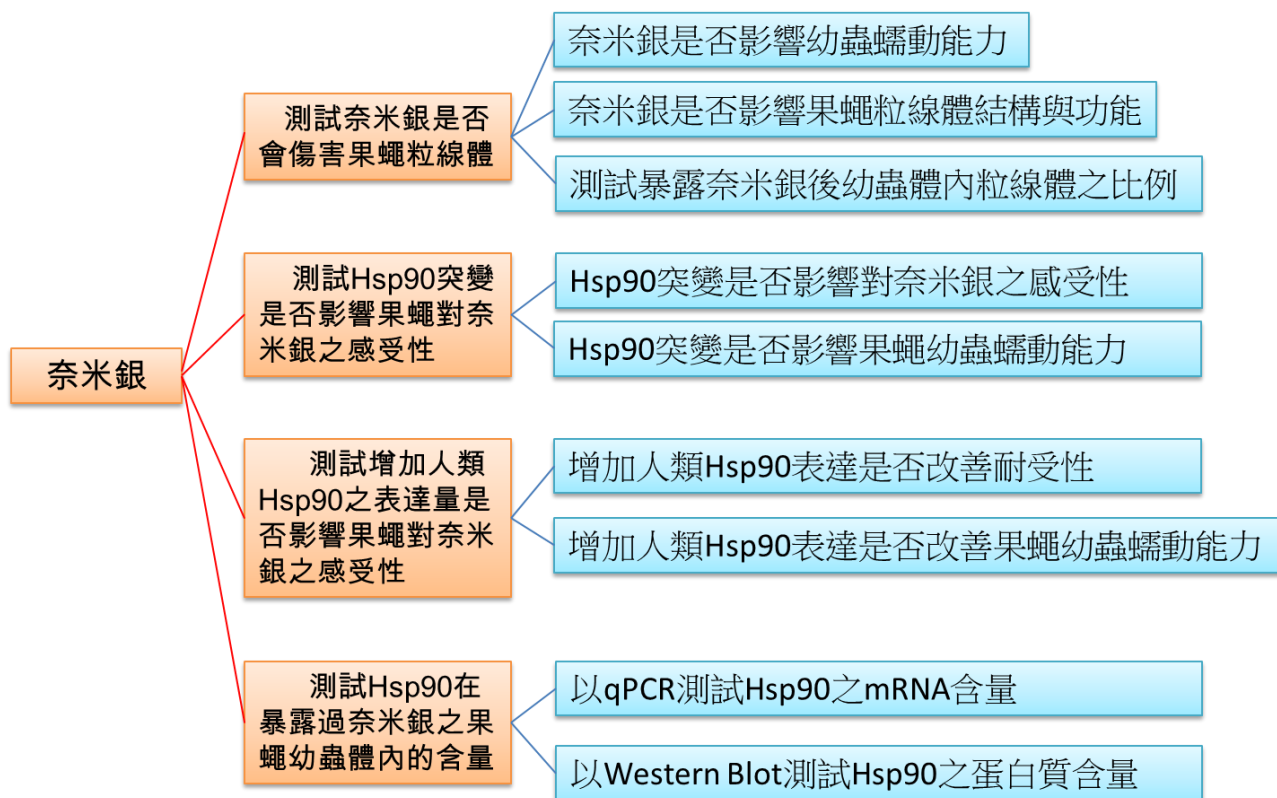
四、蘋果汁瓊脂培養基配方:

Treetop 蘋果汁	300	ml
RO H <sub>2</sub> O	676.2	ml
Agar	30	g
Preservative A	10.6	ml
Preservative B	13.2	ml
Sucrose	17	g

(表四)

## 肆、研究過程或方法

### 一、研究架構

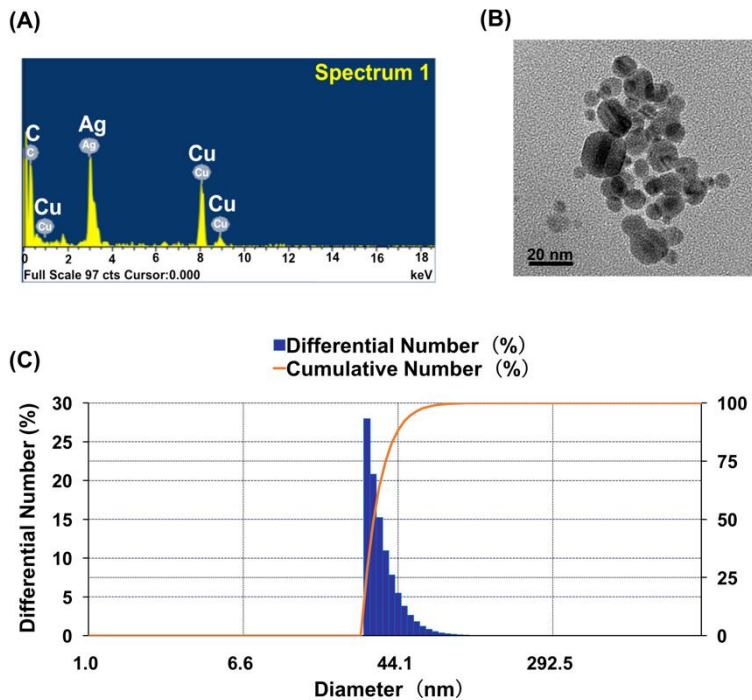


圖一：本研究架構。

### 二、奈米銀溶液製備

#### (一)簡介

本研究使用粒徑約為20 nm之奈米銀，有檸檬酸根包覆(citrate-coated)使其較為穩定，並以水性溶膠的形式添加到果蠅的培養基中，均勻混合後再讓果蠅的幼蟲透過飲食的方式暴露，以探討奈米銀暴露對粒線體之結構與功能性的影響，並釐清Hsp90是否有保護生物個體抵抗奈米銀毒性之功效與機轉。我們參照文獻中以化學還原之合成方法來製備奈米銀水性溶膠(Mulfinger et al., 2007)，圖二與表五是我們所使用之奈米銀物化特性分析結果(Mao et al., 2018)。



圖二：奈米銀之物化特性分析。(A)能量分散 X 射線元素組成光譜光分析結果；(B)穿透式電子顯微鏡之粒徑與型態分析結果；(C)水合動態粒徑分析結果。

Table 5. Physico-chemical properties of the synthetic AgNPs and their measurements.

Items of Physico-chemical properties	Measurement	Citrate-capped AgNPs
Morphology	TEM	Roughly spherical
Actual diameter (nm)	TEM	18.2 ± 8.2
Hydrodynamic diameter (nm)	DLS	32.8 ± 4.4
Polydispersity index (PDI)	DLS	0.304 ± 0.037
Chemical composition	EDX	Silver (100%)
Zeta potential (mV)	PALS	-23.6
Maximum absorbance (nm)	UV-Vis	391

Transmission electron microscopy (TEM); Dynamic light scattering (DLS); Energy-dispersive X-ray spectroscopy; Phase analysis light scattering (PALS); Ultraviolet visible spectrometry (UV-Vis)

(表五：合成奈米銀之物化特性)(Mao et al., 2018)

## (二)、合成程序與濃度定量

- 1、混合硝酸銀與檸檬酸鈉溶液
- 2、以蠕動幫浦滴定至一盛裝硼氫化鈉之錐形瓶中(800rpm、溫度4℃，鋁箔避光)
- 3、粗離心
- 4、高速離心以濃縮奈米銀，取下沉液
- 5、以石墨爐原子吸收光譜儀分析溶液中奈米銀之濃度。

## 三、果蠅培養基製備

### (一)、簡介

本研究使用瓊脂、葡萄糖、黑糖、酵母粉末、玉米粉、為主要材料製成果蠅培

養基。為了防止長時間、高濕度、高溫度的培養造成培養基中真菌滋生，我們在當中添加了具防腐特性之苯甲酸甲酯、丙酸做為防腐劑。在配製添加奈米銀之果蠅培養基前，我們讓奈米銀在 4°C 超音波震盪槽(800W)中震盪 10 分鐘來減少其保存時可能產生的聚集現象，然後再按測試劑量(包括 10 µg/ml、30 µg/ml 與 50 µg/ml)將奈米銀添加於還未凝固之果蠅培養基，由於奈米銀在食物中可能產生質變，所以須以新鮮配置之含奈米銀之果蠅培養基進行暴露實驗。

## (二)、過程

- 1、取表三中除 preservative A、B 以外之配方，加熱。
- 2、待沸騰且 agar 完全溶解後加入 preservative A、B。
- 3、置於 60°C 水浴槽中，視需要添加奈米銀。
- 4、移液置空塑膠試管中，等待冷卻。

## 四、卵之收集

### (一)、簡介

我們用集卵器、蘋果汁瓊脂培養基(“apple-juice agar” plate)供果蠅成蟲交配產卵。集卵器(figure2)為底面直徑約 9 公分，單面開口之圓柱體。一面有紗網攔阻的氣孔，另一面放置 apple-juice agar plate 以收集卵(圖三)，待卵孵化後，我們再挑取幼蟲進行暴露實驗。

### (二)、過程

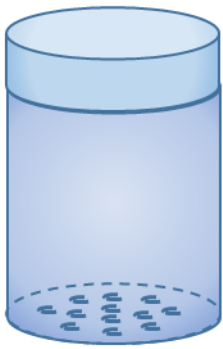
#### 1、apple-juice agar plate

- (1)、將表四中材料混合於一血清瓶
- (2)、以 121°C、20 分鐘濕熱滅菌處理
- (3)、倒入空的 petri dish 中
- (4)、冷卻後儲放於 4°C 環境

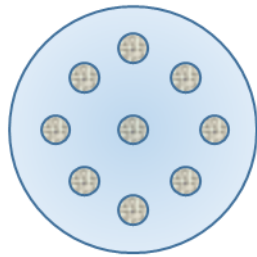
#### 2、製成集卵器

- (1)、取足量成蟲公母果蠅。
- (2)、倒入集卵器中。
- (3)、apple-juice agar plate 上灑酵母粉。
- (4)、蓋上集卵器。
- (5)、置於 25°C、濕度 60%之培養箱中，每日更換 apple-juice agar plate 並清潔。



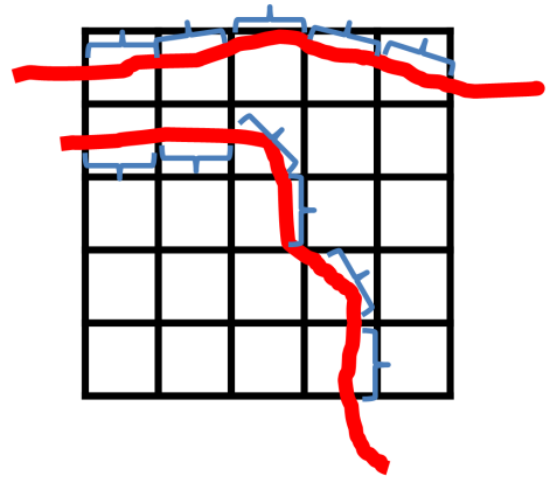


(A)



(B)

圖三：果蠅集卵器。(A)圓柱形之集卵器，開口面（圖示上方）可接蘋果汁瓊脂培養基盤，其下方為 (B)有覆蓋紗網之氣孔。以此集卵器（將圖示集卵器倒置）收集卵，隔天後取下培養基盤，待卵孵化後再挑取幼蟲進行奈米銀暴露實驗。



圖四：評估果蠅幼蟲蠕動能力之示意圖(方格大小為  $0.2\text{ cm} \times 0.2\text{ cm}$ )

## 五、粒線體產生 ATP 功能損害之檢測

### (一)、簡介

在動機的部分，我們提及 Hsp90 對粒線體恆定有著重要功能，而過許多利用細胞模式(*in vitro*)所做的研究已發現粒線體為奈米銀的胞內攻擊標靶之一。我們欲釐清奈米銀是否能藉由飲食暴露的方式在生物體內模式誘發粒線體損傷，首先我們先分析果蠅的整體 ATP 產生量，藉以推論粒線體的功能性是否受到奈米銀暴露影響。我們使用 BioVision 之 ATP 吸光法/螢光法分析套組(Catalog # K354-100)及去蛋白質套組(Catalog # K808-200)測定果蠅體內 ATP 含量。

### (二)、過程

#### 1、準備樣品

- (1)、加入 ATP assay buffer，均質化(homogeneous)果蠅
- (2)、取上清液與過氯酸(perchloric, PCA)混合，靜置 5 分鐘。
- (3)、離心，取上清液
- (4)、加入中和液，靜置 5 分鐘
- (5)、將樣品加至 96 well plate 中。用專用緩衝液補體積至每孔  $50\ \mu\text{l}$

#### 2、繪製標準曲線

- (1)、將乾燥的標準 ATP 樣品溶解於蒸餾水中，備用。

(2)、將 10  $\mu$ l 標準 ATP 樣品加入 900  $\mu$ l d.d.H<sub>2</sub>O 稀釋。

(3)、96 well plate(三重複) 加(2、)中溶液 0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ l, 補專用緩衝液至 50  $\mu$ l

### 3、反應所需藥品配製

(1)、使用螢光法，配方如下:

ATP 專用緩衝液	916	$\mu$ l
2、ATP probe	4	$\mu$ l
3、ATP converter	40	$\mu$ l
4、顯影劑混合液	40	$\mu$ l

(2)、取每孔 50  $\mu$ l, 分別加入樣品及標準樣品所在孔位。

### 4、測量:

(1)、室溫下避光 30 分鐘。

(2)、用 elisa reader 進行螢光分析(放射波長/激發波長=535/587)

(3)、收集數據

## 六、粒線體結構分裂/融合之狀態觀察

### (一)、簡介

粒線體之功能性取決於其結構上的完整性以及分裂/融合之狀態，所以我們透過觀果蠅組織中的粒線體分佈以及分裂/融合之狀態，來評估奈米銀對粒線體的結構是否有影響。我們將表達 mitoGFP 且受奈米銀暴露之果蠅三齡幼蟲解剖，取出特定組織(腦和腸子)，觀察粒線體之分布與結構變化。

### (二)、過程

#### 1、解剖

(1)、取三齡幼蟲，置於 PBS，使其懸浮

(2)、以鑷子切開身體後半段

(3)、鑷住頭，將表皮推開，使內臟外露

(4)、鑷住頭，去除多餘器官

(5)、取腦或腸子

#### 2、染 DAPI

(1)、以 PBS 潤洗組織

(2)、將組織浸入 DAPI

(3)、靜置數分鐘

(4)、再以 PBS 潤洗，去除多餘 DAPI

### 3、觀察

- (1)、置於共軛焦顯微鏡下觀察
- (2)、DAPI 顯示出細胞位置(細胞核)
- (3)、觀察粒線體(表達 GFP 之細胞結構)之分佈與結構

## 七、奈米銀對果蠅之毒性評估實驗

### (一)簡介、

我們透過檢測果蠅生命週期中蛹化與羽化之情形，來探討 Hsp90 的表達程度對果蠅抗受奈米銀毒性能力的影響。實驗分成暴露組(10  $\mu\text{g/ml}$ , 30 $\mu\text{g/ml}$  與 50  $\mu\text{g/ml}$ )與未暴露組(0  $\mu\text{g/ml}$ )，每組各 5 管，每管培養基放 50 隻幼一齡幼蟲(1<sup>st</sup> instar larvae)，暴露至三齡(3<sup>rd</sup> instar larvae) 晚期後，幼蟲會爬至管壁蛹化，然後點算蛹的數量，而後亦紀錄羽化成蟲之數量，除以最初放入的幼蟲數，即為蛹化率與羽化率。實驗中，果蠅皆置於 25°C、濕度 60%、12 小時晝夜交替之培養箱中。

### (二)、過程

- 1、準備底部盛果蠅培養基之塑膠試管，以鋁箔避光
- 2、將一齡幼蟲以挑蟲針從 apple-juice agar plate 移置管中。
- 3、培養。
- 4、及其蛹化、羽化，觀察並紀錄之。

## 八、果蠅幼蟲爬行能力受奈米銀毒性影響實驗

### (一)、簡介

我們假設藉由飲食暴露之方式，奈米銀會在果蠅組織誘發粒線體結構與功能性損傷，粒線體為 ATP 的製造工廠，粒線體的損傷會影響生物能量產生，所以其極可能會干擾到生物的運動能力。我們設計此實驗以檢測奈米銀對果蠅的運動能力之影響。如上述蛹化率與羽化率的評估實驗，我們將幼蟲於一齡(1<sup>st</sup> instar larvae)至三齡(3<sup>rd</sup> instar larvae) 階段暴露在含奈米銀之培養基中，並於三齡蟲階段將其移至瓊脂糖膠盤(agarose gel plate)上，估算其爬行距離。實驗中，果蠅皆置於 25°C、濕度 60%、12 小時晝夜交替之培養箱中。

### (二)、過程

- 1、準備底部盛果蠅培養基之塑膠試管，以鋁箔避光
- 2、將一齡幼蟲以挑蟲針從 apple-juice agar plate 移置管中。
- 3、培養。
- 4、以 20%蔗糖水溶液使其浮起，並以 RO H<sub>2</sub>O 清洗之。

- 5、準備一 3.5% agarose gel plate。
- 6、準備一 0.2cm x0.2cm 之方格紙，墊於 agarose gel plate 下。
- 7、以具攝影功能之解剖顯微鏡拍攝，計時一分鐘。
- 8、以「體長中點位置越過一條線」為越過一格之標準(圖三)，估計之。
- 9、計算爬過格線數，並記錄之。

## 九、以 qPCR 方式測試奈米銀劑量與 Hsp90 之 mRNA 表達量之間的關係

### (一)簡介

Hsp90 為細胞應對壓力時的一個重要蛋白，我們欲探討面對不同劑量之奈米銀毒性下 Hsp90 是否能正常轉錄初期 mRNA，因此以 qPCR 方式測定果蠅在不同劑量的奈米銀暴露下其 mRNA 表現量。

### (二)過程

撰寫於附錄一中。

## 十、以 Western Blot 方式測試奈米銀劑量與 Hsp90 之蛋白質表達量之間的關係

### (一)簡介

在測定 mRNA 之表現量後，我們欲更進一步討論轉錄出來的 Hsp90 之 mRNA 能否正常轉譯出 Hsp90 之蛋白至，因此以 Western Blot 之方法測定果蠅在不同劑量的奈米銀暴露下其 Hsp90 表達量。

### (二)過程

撰寫於附錄二中。

## 十一、以 PCR 方式測試粒線體 DNA 在細胞中的相對數量(copies number)

### (一) 簡介

在粒線體產生 ATP 功能損害之檢測及粒線體結構分裂/融合之狀態觀察中我們發現奈米銀暴露會影響果蠅中粒線體之功能與結構，我們欲探討粒線體之 biogenesis 所受到的影響並量化粒線體之數目，以對奈米銀之毒理有更加深入的探討。

### (二) 過程

撰寫於附錄三中。

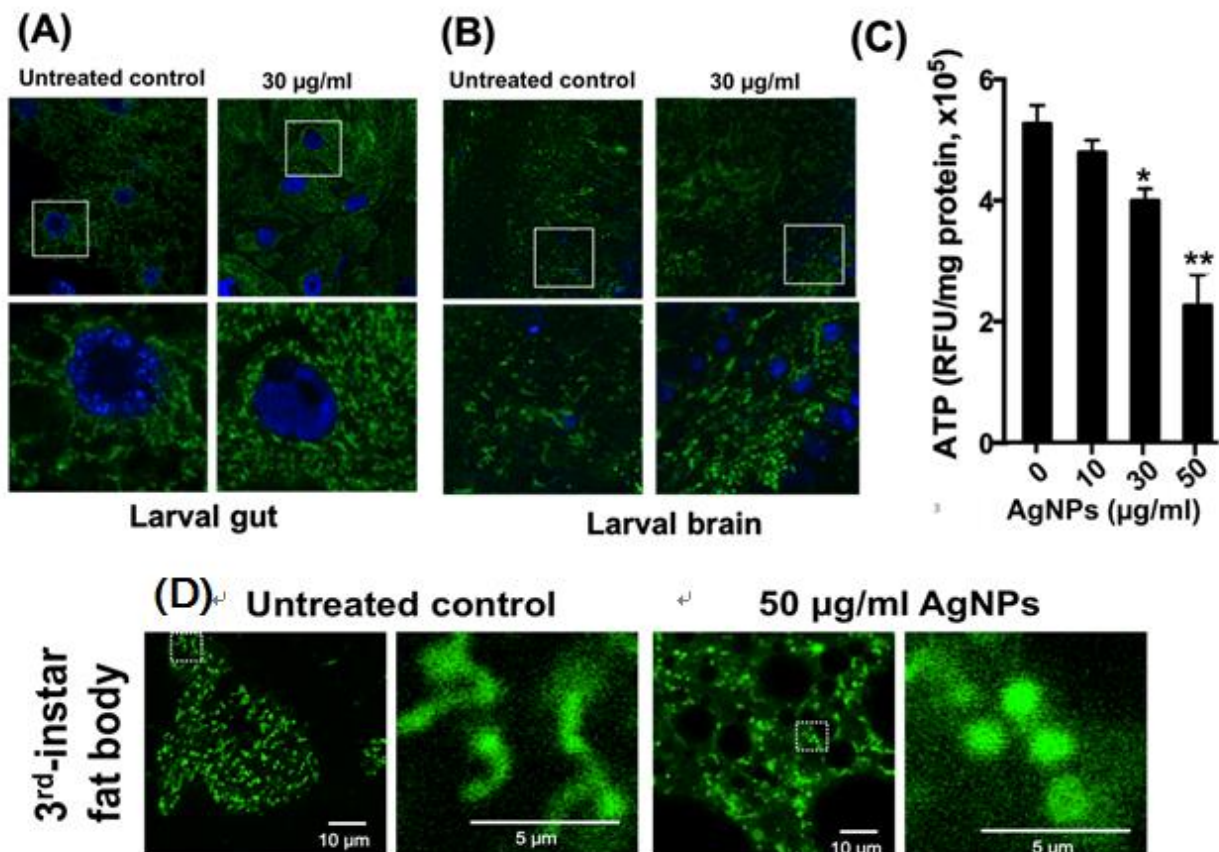
## 九、數據分析

我們使用 Student' s T test 做為比較兩數據間差異的方法。以 levene test 做變異數之 F test。其中  $p < 0.05$  為可交受的信心水準。圖中標示\*、# 符號以表明檢定不拒絕  $H_0$  之機率。\*表  $p < 0.05$ ; \*\*表  $p < 0.01$ ; \*\*\*表  $p < 0.001$

## 伍、研究結果

### 一、暴露奈米銀造成粒線體結構與功能性之損害

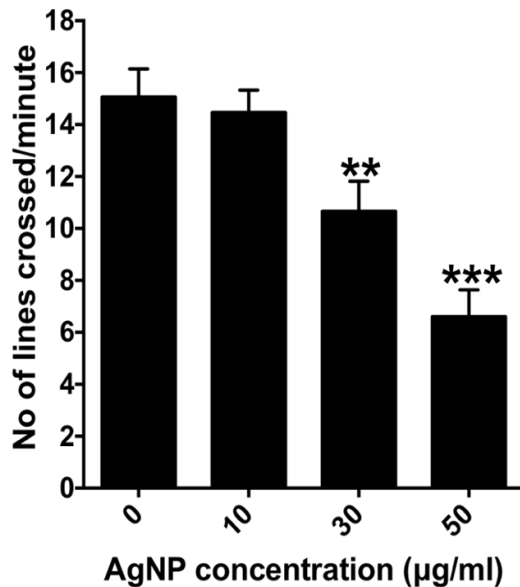
本研究第一個目的即在檢測奈米銀是否真對粒線體造成影響，而已有研究(Mao et al., 2018)證實致死劑量(Lethal dose)的奈米銀會造成果蠅成蟲體內活性氧類物質(reactive oxygen species, ROS)含量上升。因此，我們猜測，奈米銀是否也對氧化還原旺盛的粒線體具有結構性或者功能性的影響。我們於是選擇能在粒線體表達綠色螢光蛋白(mitochondria green fluorescence protein, mitoGFP)之果蠅品系進行粒線體結構之觀察，如圖五(A)所示，受奈米銀暴露的果蠅，整體的腸道細胞粒線體數量都有明顯增加的現象，且變得比較片斷化；相較之下，圖五(B)指出果蠅的腦部的粒線體只有靠近表面（DAPI 的染色只能染到腦部結構的表層）的腦細胞的有稍微明顯的數量增加與片斷化的現象。而圖五(D)則顯示在果蠅的脂肪體(fat body)中暴露奈米銀組的粒線體可以看到明顯地從絲狀(fusion)轉為較破裂(fragmentation)之形式。這些結果顯示奈米銀暴露可能會提升粒線體 biogenesis 且導致其片斷化，進而影響其產生 ATP 的能力。如圖五(C)所示，我們確實也觀察到奈米銀的暴露會呈現劑量相依的方式降低 ATP 的產生量。



圖五：奈米銀暴露對粒線體結構與功能的影響。果蠅的(A)腸道與(B)腦部(D)脂肪中粒線體的分佈與結構；(C)果蠅體內 ATP 含量之測定結果。

## 二、暴露奈米銀降低果蠅幼蟲之蠕動能力

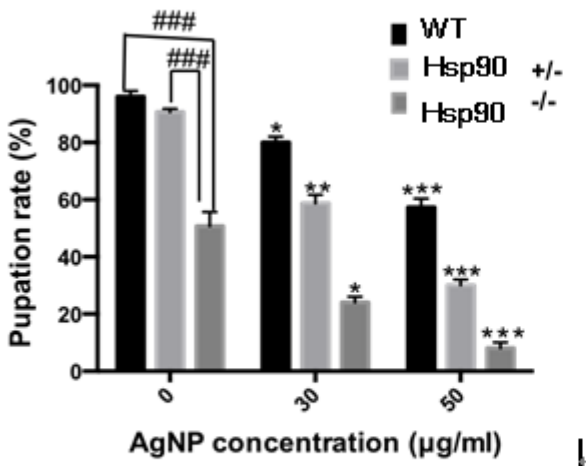
確認粒線體確實受到奈米銀暴露而有結構與功能性的損傷後，我們進一步地去評估果蠅的運動能力是否也受到奈米銀的暴露而影響，於是我們幼蟲的蠕動能力作為評估指標，發現奈米銀的暴露確實會損害幼蟲的蠕動能力（如圖六所示）。



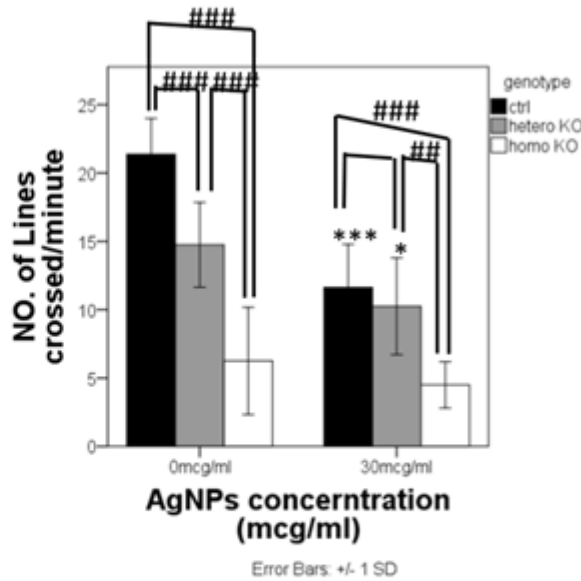
圖六：奈米銀暴露對果蠅幼蟲蠕動能力之影響。

## 三、Hsp90 基因之同型合子突變（無表達 Hsp90 蛋白）相較於異型合子突變體（約略半量表達 HSp90 蛋白）似乎更易受奈米銀毒性影響。

已知的研究中(Felts et al., 2000), Hsp90 和粒線體之恆定有關，於是我們猜測 Hsp90 的表達量可能會藉由調節奈米銀對粒線體的毒性而影響果蠅個體對奈米銀的抗受能力。如圖七所示，在未受奈米銀暴露的情況，Hsp90 的突變似乎就會影響到幼蟲的存活與蛹化能力，且相較於異型合子突變，同型合子突變的影響更大。受奈米銀暴露之後，三組幼蟲的存活與蛹化能力都顯著顯著下降（以星號表示顯著性），奈米銀對同型合子突變體的負面影響比對異型合子突變體的影響來得強烈。在原先的成果報告書中，幼蟲的蛹化率下降趨勢並未與幼蟲體內的 Hsp90 含量下降有明顯相依性，然而，在新一輪的實驗當中，我們發現蛹化率之下降與幼蟲體內 Hsp90 含量有所關連。



圖七：奈米銀對 Hsp90 同型合子突變體、異型合子突變體與正常表達之對照組之蛹化能力影響評估。



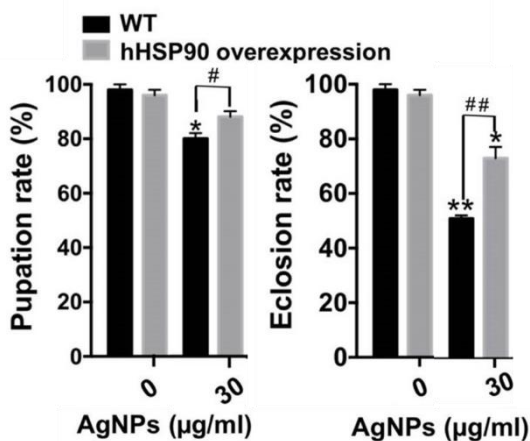
圖八：Hsp90 表達量影響果蠅蠕動能力。

四、Hsp90 基因之同型合子突變（無表達 Hsp90 蛋白）其蠕動相較於異型合子突變體（約略半量表達 HSp90 蛋白）更易受奈米銀毒性影響。

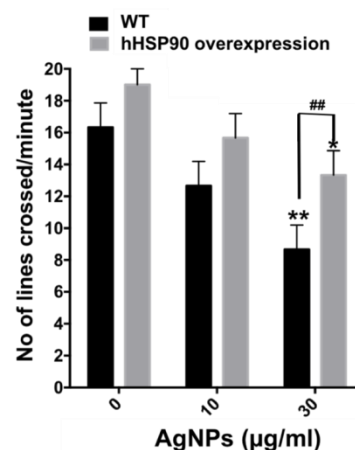
在知道 Hsp90 基因和果蠅耐受力之關係後，我們想確認 Hsp90 和運動能力的關係，在蠕動能力測試中，我們可以看出 Hsp90 基因和蠕動能力之間的相關性，而在暴露奈米銀的組別中，Hsp90 的表達量和蠕動格子數有顯著相關(圖八)。

五、增加表達人類 Hsp90 表達量提升使果蠅具較好之奈米銀耐受力

為進一步了解 Hsp90 基因表達量和果蠅生長的關係，我們選擇增加表達人類 Hsp90 基因的品系進行蛹化、羽化情形的檢測。由於在人類體內亦有相似的基因序列，我們增加人類的 Hsp90 基因於果蠅體內，檢測增加人類 Hsp90 的表達是否能改善奈米銀對果蠅耐受力下降的問題，藉由人類 Hsp90 基因於果蠅模式取得之研究成果，我們希望未來對人體生理機轉之研究能有新的進步。於圖九中可見基因表達量之增加和果蠅蛹化、羽化數量之提升有關。



圖九：增加 hsp90 表達量提升暴露奈米銀之果蠅蛹化、羽化能力。

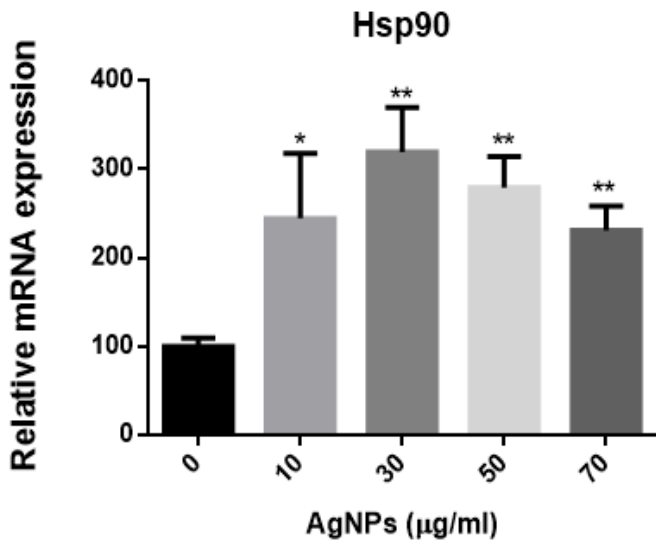


圖十：增加 hsp90 表達量提升暴露奈米銀之果蠅蠕動能力。

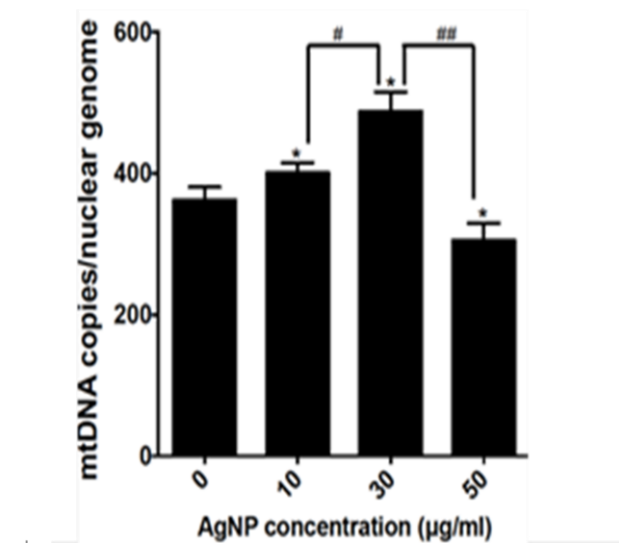
## 六、Hsp90 表達量提升減輕奈米銀對蠕動能力造成損害

知道提升人類 Hsp90 基因表達量緩解奈米銀造成毒性後，我們想了解提升 Hsp90 表達量伴隨的效果是否和幼蟲蠕動能力有關。於是我們進行了如是實驗。而於圖十中可見增加表達和奈米銀對蠕動能力傷害之減少有關，而未暴露奈米銀但增加表達的品系蠕動能力亦較野生種佳。

## 七、以 qPCR 測試在一齡到三齡之間暴露於奈米銀之幼蟲其 Hsp90 之 mRNA 表現量



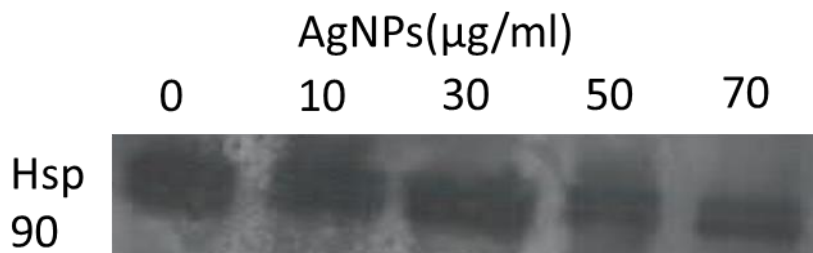
圖十一:幼蟲體內 Hsp90 之 mRNA 相對含量



圖十三:奈米銀影響果蠅中粒線體之數量

由圖十一可以看出 Hsp90 之 mRNA 表現量在奈米銀濃度為 0 至 30 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 時，隨奈米銀濃度之上升表現量也有上升之情形，推測是因為 Hsp90 受壓力後引發表現量上升 (stress-induced)，而在劑量為 50 至 70 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 時，我們發現表現量隨著奈米銀濃度提高而下降，推測是高濃度奈米銀使 Hsp90 上游感受壓力之機轉遭到破壞，導致 Hsp90 的表現量下降。

## 八、以 Western Blot 測試在一齡到三齡之間暴露於奈米銀之幼蟲其 Hsp90 之蛋白質表現量



圖十二:奈米銀影響 Hsp90 蛋白質之表現量



圖十二為 Western Blot 之初步結果，由於實驗上之問題，尚無 internal control 之 data，但若是假設定量方面沒有錯誤，就初步結果來看 Hsp90 之蛋白質表現量是與 qPCR 得出的 mRNA 表現量趨勢大致相同，未來將會完善此實驗，以確定 Hsp90 蛋白質表現量與奈米銀劑量之間的關係。

九、以 mtDNA copies/nuclear DNA 之 ratio 值探討奈米銀濃度與粒線體總數之關係

圖十三為粒線體 DNA 對總細胞 DNA 之相對數量，是對於圖一實驗的後續探討，在圖一的實驗中我們發現暴露於奈米銀下粒線體的數量與結構均有改變，而 ATP 的產量隨著奈米銀的劑量升高隨之下降，而在圖十三的實驗中我們得知果蠅在低劑量之奈米銀(10 至 30  $\mu$ g/ml)暴露下，粒線體相對數量隨奈米銀劑量的升高而增多，然而，暴露於高劑量之奈米銀(50  $\mu$ g/ml)下會導致粒線體之數量下降。

## 陸、討論及應用

- 一、由暴露奈米銀的幼蟲蠕動能力下降、暴露奈米銀的果蠅體內 ATP 含量較低，並藉由 mtDNA 之數量改變，我們推測，在接受低劑量的奈米銀(0 至 30  $\mu$ g/ml)，果蠅的粒腺會藉由調控其 biogenesis，增加總粒線體之數量來維持在細胞中的正常功能，但在更高劑量的奈米銀(50  $\mu$ g/ml)時，奈米銀的毒性已經影響到更上游之分子機轉，使的粒腺體調控 biogenesis 之系統造成破壞，所以粒線體總數隨之下降。
- 二、由 Hsp90 表達下降和蛹化羽化數量下降、蠕動格數變少，我們推測，Hsp90 的表達量和果蠅健康情形有關。
- 三、由增加表達人類 Hsp90 基因可改善果蠅蛹化、羽化情形、增加表達人類 Hsp90 基因可改善果蠅幼蟲蠕動能力。我們推測，在果蠅模式取得之人類 Hsp90 奈米銀毒性抗受研究成果或與人類體內 Hsp90 之作用機轉有關。
- 四、由 qPCR 與初步 Western Blot 之結果判斷，在低劑量之奈米銀(0 至 30  $\mu$ g/ml)下，Hsp90 之表現量隨著劑量的上升而升高，我們推測，這可能是因為 Hsp90 因壓力而表現之特性(stress-induced)，當細胞感受到奈米銀之毒性時，可以藉由 Hsp90 表達量的上升來抵抗奈米銀之毒性，然而，在較高劑量(50 至 70  $\mu$ g/ml)時，Hsp90 之表達量隨著劑量的增多而下降，這可能是因為奈米銀的毒性使控制 Hsp90 轉錄或更上游之機轉被奈米銀的毒性破壞，導致細胞無法產生足夠的 Hsp90 來抵禦奈米銀之毒性。
- 五、由圖一及圖十三的實驗中得知，奈米銀的確會應響粒線體之 biogenesis，在低劑量之奈米銀下(0 至 30  $\mu$ g/ml)，細胞可以透過調控粒線體之數量來抵禦奈米銀之毒性，而由實驗結果我們推測雖然粒線體之總數藉由調控 biogenesis 而變多，然

而奈米銀同時也影響粒線體之正常功能(製造 ATP 之能力)，因而造成粒線體總數變多，但 ATP 含量卻下降的矛盾現象。而在高劑量之奈米銀(50  $\mu$ g/ml)，奈米銀之毒性可能已經影響到了調控粒線體之 biogenesis 的上游機轉，所以粒線體之數量才不升反降。

#### 六、未來努力方向:

- (一)、可增加實驗之樣本數，以求實驗數據之證據力，並完善 Western Blot 之實驗。
- (二)、事實上，我們亦有進行增加表達人類 Hsp90 但無 ATP 結合位品系之實驗，若實驗結果肯定則可說明人類 Hsp90 對增加果蠅耐受力之機轉是否關乎 ATP 之導使。礙於實驗尚未完整，未能撰諸文中，尚屬可惜。
- (三)、可進行增加人類 Hsp90 表達是否改善粒線體結構與功能之實驗，以完滿本研究之論點。
- (四)、可進行以羽化率作為指標下，Hsp90 突變果蠅對奈米銀毒性易感受性之實驗。
- (五)、在參考文獻中發現果蠅攝食奈米銀會造成 Hsp70 之蛋白質表現量上升，而 Hsp70 也是重要之分子伴護蛋白(chaperone)，但該參考文獻中並沒有對 Hsp70 表達量與果蠅抵禦奈米銀之抗受性的關係討論，希望未來我們能探討其他的分子伴護蛋白對果蠅抵禦奈米銀毒性之影響。

#### 七、應用

- (一)、可對現今含奈米銀之產品(尤其是食品包材)之毒性作為探討。
- (二)、若能確立奈米銀對於 Hsp90 之機轉，由於癌細胞之 Hsp90 具大量增生之特性，或可將奈米銀作為對抗癌症之手段。

#### 柒、結論

- 一、暴露於奈米銀影響粒線體之結構、功能、數量，造成 ATP 產量下降。
- 二、暴露於奈米銀降低幼蟲蠕動能力。
- 三、蠕動力下降與 ATP 產量下降或有關連。
- 四、Hsp90 基因之表達量下降使得果蠅之蛹化、羽化數量下降。
- 五、Hsp90 基因之表達量下降與果蠅之蛹化、羽化數量有關。
- 六、Hsp90 基因之表達下降使得果蠅幼蟲蠕動格數下降。
- 七、提升 Hsp90 基因表達量改善果蠅對奈米銀之耐受性。
- 八、提升 Hsp90 基因表達量改善果蠅蠕動能力。

九、Hsp90 之表達量與奈米銀之劑量有所關聯。

#### 捌、參考文獻及其他

- 一、Administration, U. S. F. D. (2018). 510(k) Premarket Notification.  
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMN/pmn.cfm?ID=K050842>
- 二、Felts, S. J., Owen, B. A., Nguyen, P., Trepel, J., Donner, D. B., & Toft, D. O. (2000). The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(5), 3305-3312.
- 三、Johnston, H. J., Hutchison, G., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., & Stone, V. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical reviews in toxicology*, *40*(4), 328-346.
- 四、Mao, B.-H., Chen, Z.-Y., Wang, Y.-J., & Yan, S.-J. (2018). Silver nanoparticles have lethal and sublethal adverse effects on development and longevity by inducing ROS-mediated stress responses. *Scientific Reports*, *8*(1), 2445.
- 五、Mao, B.-H., Tsai, J.-C., Chen, C.-W., Yan, S.-J., & Wang, Y.-J. (2016). Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy. *Nanotoxicology*, *10*(8), 1021-1040.
- 六、Mulfinger, L., Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., & Boritz, C. (2007). Synthesis and study of silver nanoparticles. *J. Chem. Educ*, *84*(2), 322.
- 七、Nowack, B., Krug, H. F., & Height, M. (2011). 120 years of nanosilver history: implications for policy makers: ACS Publications.
- 八、Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., & Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein journal of nanotechnology*, *6*, 1769.

## Methods for *Drosophila* RNA extraction, cDNA preparation and real-time qPCR analysis

### I. RNA extraction

#### (1) Reagents:

- **TRIzol reagent**, which contains **acidic phenol** and **guanidinium thiocyanate** (Wrapped with aluminum foil and placed at 4°C)
- **Chloroform** (Wrapped with aluminum foil and placed at RT)
- **Isopropanol** (Wrapped with aluminum foil and placed at RT)
- **75% Ethanol** (in sterilized DEPC-treated MQ water; placed at 4°C)
- **RNase-free water** (sterilized DEPC-treated MQ water; placed at 4°C)

**[Caution]: Wear gloves and mask while conducting RNA extraction**

#### (2) Procedures

##### A. Homogenization:

- **Homogenize the tissue samples in 200 µl of TRIzol reagent by using a bead mill homogenizer at 4°C. (Speed:  $\geq 7$ , if it fails to work properly, the speed should increase.) Stop the homogenization process per minute, and carry out low-speed centrifugation to spin down samples. [**Glass beads** are used for **adult samples** while **steel beads** are used for larval and pupal samples; In general, a total of 10 larvae/pupae/adults are subjected to RNA extraction. The amount of the beads approximately equals to the **half volume of the samples.**]**

**[Note]: An insufficient amount of TRIzol reagent may result in contamination of the isolated RNA with DNA.**

- **Add 600 µl of TRIzol reagent and mix well by some gentle inversions. Incubate the homogenized samples at RT for 5 min to permit the complete dissociation of nucleoprotein complexes.**

##### B. Phase separation:

- **Add 160 µl of chloroform (1/5 volume of TRIzol solution). Shake the microtubes vigorously by hand for 15 seconds and incubate them at RT for 3 minutes.**
- **Centrifuge the samples at (no more than) 12,000 x g (rcf) for 15 minutes at 4°C.**

**[Note]:** The mixture separates into a lower phenol-chloroform layer (organic phase) containing proteins and lipids, a thin interphase layer, and a colorless upper layer (aqueous phase containing RNA. Owing to the acidic phenol, DNA precipitates into the organic phase while RNA remains in the aqueous phase.)

- Transfer the aqueous phase containing the RNA to a fresh 1.5 ml microtube by angling the sample tube at 45° and pipetting the solution out.

#### **C. RNA precipitation:**

- Precipitate the RNA by mixing with 400 µl of isopropanol. Shake the microtubes gently by hand for 15 seconds
- Incubate the samples at RT for 10 minutes.
- Centrifuge at no more than 12,000 xg (rcf) for 10 minutes at 4°C. The RNA precipitate will form a gel-like pellet on the side and bottom of the tube.

#### **D. Wash RNA**

- Remove the supernatant. Add 750 µl of sterile DEPC-treated water- prepared 75% ethanol to wash the RNA pellet. Mix the samples by gentle inversions.
- Centrifuge at no more than 7,500 xg (rcf) for 5 minutes at 4°C.

**[Note: The RNA samples can be stored with 75% ethanol at -80°C, or redissolved for further use.]**

#### **E. Redissolving RNA**

- Remove the supernatant. Briefly air-dry the RNA pellet at the laminar flow hood until it becomes transparent (**[Note]:** Open the cap, and invert the microtube.) Be careful not to let the RNA pellet over-dried as this will greatly decrease its solubility.
- Dissolve RNA in 20 µl of RNase-free (sterilized DEPC-treated) MQ water by flipping the tube a few times, and incubating for 10 minutes at 65°C. (**[Note]:** Check the actual temperature by

using the thermometer before placing the microtubes into the dry bath incubator.)

#### F. RQ1 DNase I treatment

- Set up the DNase digestion reaction (30  $\mu$ l) as follows:

RNA in RNase-free water	15 $\mu$ l
RQ1 RNase-free DNase 10x reaction buffer	3 $\mu$ l
RQ1 RNase-free DNase I	10 $\mu$ l
RNase-free water	2 $\mu$ l

**[Note]:** The RQ1 RNase-free DNase digestion contains a final concentration of 10 mM MgSO<sub>4</sub>. When adding the DNase-treated RNA to an RT-PCR reaction (to perform reverse transcription, carryover of magnesium must be considered. The requirement for magnesium may be different in the RQ1 DNase digestion step and in the PCR amplification reaction. For some templates, the yield from the amplification reaction is highly dependent on the Mg<sup>2+</sup> concentration, and the optimal Mg<sup>2+</sup> concentration may be as low as 1 mM.

- Incubate at 37°C for 30 minutes. (**[Note]:** Check the actual temperature by using the thermometer before placing the microtubes into the dry bath incubator.)
- 
- Add 3  $\mu$ l of RQ1 DNase Stop Solution to terminate the reaction. Incubate at 65°C for 10 minutes to inactivate the DNase. (**[Note]:** Check the actual temperature by using the thermometer before placing the microtubes into the dry bath incubator.)

## II. Measurement and calculation of isolated RNA concentration

**[Note]:** The traditional method for assessing RNA concentration and purity is UV spectroscopy/spectrophotometry. The absorbance of a diluted RNA sample is measured at 260 and 280 nm. The nucleic acid concentration is calculated using the Beer-Lambert law, which predicts a linear change in absorbance with concentration.

- Warm up the spectrophotometer 20 minutes ahead prior to assessment.

- Use sterilized DEPC-treated MQ water as a solvent to carry out 50-fold dilution of the RNA samples (3 µl of sample + 147 µl of DEPC-treated MQ water). Be cautious to carry out pipetting of the well-mixed sample (i.e. by vortex and spin-down) at this step so as to obtain precise concentrations.
- “Zero” the spectrophotometer with 150 µl of DEPC-treated MQ water (as the blank). The readings of the absorbance should be zero.

[Note]: All measured samples have to be loaded into the quartz cuvette. Decant off the samples while finishing the measurement, and wash the quartz cuvette with MQ water.  
 [Caution]: Don't touch the bottom of the cuvette with fingers, and wipe the bottom parts with Kimwipe prior to measurement.

- Carry out sample measurements and record the readings of A<sub>260</sub> (i.e. A<sub>1</sub>) (should be between 0.15 and 1.0) and the ratio of the readings at 260 nm and 280 nm (which indicates RNA purity). Touch “start” three times to acquire 3 records.

[Note]: Pure RNA has an A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ratio of 1.9-2.2. If there is contamination with protein or phenol, the A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> will be significantly less than the values given above, and accurate quantification of the amount of RNA will not be possible.

- Since the optical density at 260 nm (OD<sub>260</sub> or A<sub>260</sub> or A<sub>1</sub>) equals 1 for a 40 µg/ml solution of RNA, the concentration of the isolated RNA should be calculated as follows:

$$[\text{RNA}] = \text{Mean A}_1 \text{ value} \times 40 \times 50/1000 \text{ } \underline{\underline{\mu\text{g}/\mu\text{l}}}$$

### III. 20 µl cDNA preparation (via reverse transcription)

(The volume is approximately suitable for carrying out real-time qPCR

analysis of at least 5 target genes)

#### (1) Reagents and materials:

- RNase-free water (sterilized DEPC-treated MQ water)
- Random hexamer (stored at -20°C)
- dNTP (stored at -20°C)
- 5X reaction buffer

- Dithiothreitol (DTT)
- Reverse transcriptase
- 1 µg RNA
- PCR tube (below the WB bench)

(2) Procedures

A. 5-min 65°C denaturation process (to result in relaxed RNA)

Total reaction volume = 13 µl

1 µg RNA (Careful pipetting is crucial)	[Calculation] µl
dNTP	1 µl
Random hexamer	1 µl
RNase-free water	[11- RNA volume] µl

B. 50-min RT incubation (37°C) and 10-min deactivation (70°C) processes

Total reaction volume= 20 µl

DTT	2 µl
Reverse transcriptase	1 µl
5 X reaction buffer	4 µl

C. Storage:

cDNA samples: stored at -20°C

RNA samples: RNA + Sodium acetate + Isopropanol (stored at -80°C)

IV. Real-time quantitative PCR

(1) Reagents:

- cDNA samples (5-fold dilution with sterilized MQ)
- 100 µM forward and reverse primer sets (needs 20-fold dilution when conducting real-time qPCR: 5 µl forward primer + 5 µl reverse primer + 90 µl sterilized MQ water)
- SYBR

(2) Reaction mixture ([Caution] Careful pipetting is critical!)

cDNA (5-fold dilution)	4 µl
Primer mixture	1 µl
SYBR	5 µl



## 附錄二

### Western blotting (*Drosophila*)實驗步驟

#### ● 前置作業

1. 開吸光儀
2. 加熱板 105°C
3. Sample 放冰上，拿 marker(-20°C)，解凍 Dye

#### ● Sample 處理

1. Sample 加研磨珠(larvae 加 1 匙鋼珠；adult 加 2 匙玻璃珠)  
Lysis buffer : 2X RIPA+ Inhibitor 150  $\mu$ l (Adult 10 隻)  
(2X RIPA + Inhibitor = 100:1)
2. 以均質機打完 sample 後，放冰上靜置 1hr (靜置時間可做膠)
3. 離心：14000 rpm，15 mins (準備新的 eppendorf)

#### ● 做膠

1. 用酒精消毒擦拭玻璃片
2. 利用桌面水平將兩片玻璃片排列緊密並放上組合
3. 加水(ddH<sub>2</sub>O/MQ)看是否會漏(10mins)，確定不會漏後倒水
4. 配膠
  - (1) 先配下膠再配上膠，AP(ammonium persulfate)和 TEMED 最後再加
  - (2) 下膠：15% 10ml；上膠：stacking gel 配一片的量
  - (3) 下膠配完以 Isopropanol 壓膠→以 200  $\mu$ l pipette 加 2 次(400  $\mu$ l)的，Isopropanol 鋪於下膠，等 20-30 mins
  - (4) 把壓膠的溶液倒掉
  - (5) 加一份的 stacking gel
  - (6) 插入尺書(注意避免氣泡產生)，等 10-20 mins

備註：gel 可提前做，做完泡在 running buffer 中冰 4°C

#### ● 測 protein (Quantitative)-Old -----利用丟棄式 cuvette

##### Standard

BSA	0	2	4	8	12	要先加好
MQ	800	798	796	792	788	
5X Bradford	200	200	200	200	200	測前才加

備註：盡快 15 mins 內測完

##### 分光光度計操作

1. 先按 quantitative→F2→F3，nm=595 後輸入不同濃度：0, 2, 4, 8, 12
2. Blank 利用 nm=595，之後依序測 0, 2, 4, 8, 12，R 值要> 0.98，若 Abs 差距太大(>濃度 12 太多)，需稀釋 Abs 大的重測，以縮小用的曲線範圍

### 3. Sample:

Sample blank:  $2\ \mu\text{l}$  (2X RIPA+ Inhibitor) +  $798\ \mu\text{l}$  MQ +  $200\ \mu\text{l}$  5X Bradford

Sample:  $2\ \mu\text{l}$  sample +  $798\ \mu\text{l}$  MQ +  $200\ \mu\text{l}$  5X Bradford

#### ● 測 protein (ELISA reader)-New

Standard

BSA	0	2	4	8	12	Sample: 2	要先加好
MQ	800	798	796	792	788	798	
5X Bradford	200	200	200	200	200	200	測前才加

1. 加完 5X Bradford 後，Vortex，小烏龜
2. 拿便宜的 96 well 盤（無蓋子），規劃好位置(control 4 重複，sample 3 重複)，一個 well load  $200\ \mu\text{l}$
3. 檢查有無泡泡，泡泡盡量要戳破
4. 上機

#### ELISA reader 使用

1. Gene5.1.0→wizard→關閉視窗→Protocol→Procedure 點 2 下→Read→wave length 輸入 595→OK
2. Read plate→read→不要存檔→溫度(ok) Layout 選 595→Excel 輸出→用實驗室電腦作圖並計算 protein loading 的量  
(備註：盡快 15 mins 內測完)

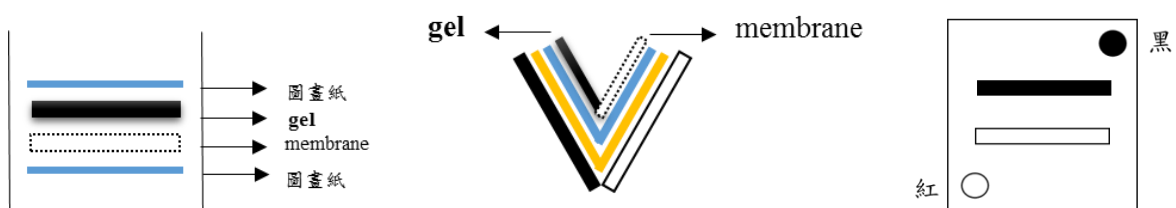
#### Protein Loading

1. 移動 gel 至電泳槽並夾好
2. 加入 running buffer (無 methanol, 不 reuse) 超越尺書
3. 拔尺書，用 pipette 補 buffer
4. Load protein 與 marker  $5\ \mu\text{l}$  (Thermo)
5. 調電壓，開始跑膠

	上膠	下膠
1 片	25A	35A
2 片	50A	70A

#### ● Transfer

1. 換新手套
2. 用夾子取 membrane ( $9\times 6\ \text{cm}$ )，用 methanol 活化
3. 圖畫紙泡 transfer buffer (含 Methanol)
4. 將 gel 切下切好
5. 圖示



Transfer buffer (10% methanol) 可用 3 次

mV=60

mA=80 mA 要低於 500

W=300

T=240 min (至少 120 min)

6. 取出 membrane，用鉛筆/原子筆標示 marker，並剪角標示正反面，切出適當大小(如有需要剪片時)，回收 transfer buffer
7. 用 TBST 洗 3 次(1 次 3 min)，可保存於 4°C in TBST  
TBST= 1X PBS + 0.05% Tween-20

- Blocking

Blocking 1 hr

Blocking solution= 0.8g (2%) BSA + TBST 至 40ml

- Add antibody

1. 配一抗= 5ml blocking buffer + 抗體 (依比例調整)
2. 倒掉 blocking buffer，加一抗 (RT 搖 2hr or in 4°C overnight)
3. 配二抗= 5ml blocking buffer + 抗體 Goat anti-mouse/rabbit (依比例調整)
4. 回收一抗，加 1/1000 NaN<sub>3</sub> (0.2g/ml)
5. TBST 洗 3 次，1 次 10min
6. 加二抗，RT 1 hr
7. TBST 洗 3 次，1 次 10min
8. 壓片/保存於 TBST 中冰 4°C

- 壓片

1. 預約暗房
2. 先將綠色壓片專用籃子拿到暗房 stand by (顯影劑、定影劑和水要先倒好，鑷子及剪刀擺放好)
3. 準備 ECL (in 4°C 冰箱，拿出白色和棕色各一瓶)，拿出後需避光操作
4. 準備 15cc 離心管，加入白色和棕色瓶各 1ml 混合，vortex
5. 倒出混和好 2ml 的 ECL 於 membrane 上，以 pipette 吸取 ECL 均勻淋在 membrane 上約 1min
6. 準備好 cassette，將透明塑膠袋兩邊以美工刀割開，小心夾取 membrane (記得正面朝上)置於塑膠袋上，喬好位置後，小心蓋上透明塑膠袋避免產生氣泡(蓋完後需檢查是否有氣泡產生)

確認完畢後帶著底片(需小心保存，絕對不可再有光之處拿出來!!!!)到暗房壓片

### 附錄三

#### Drosophila Genomic DNA Extraction

##### Solutions:

##### SolutionA:

Tris HCl 0.1M(pH9.0)

EDTA 0.1M

SDS 1%

Phenol-Chloroform-isoamyl alcohol:25:24:1

KOAc 8M

NH<sub>4</sub>OAc 10M

Isopropanol

EtOH 70% , 100%

TE

##### Procedure

40-50 flies per tube and keep on ice

1. add 200  $\mu$ l of solution A and grind flies with plastic pestle.
2. 600  $\mu$ l solution A is used to wash out debris from the pestle and mix well with the 200  $\mu$ l lysis buffer on step2(mix well by inverse)
3. Incubate sample for 30 min at 70°C
4. Cool down sample on ice for 30 min and add 122  $\mu$ l of 8M KOAc and shake (no vortexing)
5. Incubate for 30 min on ice
6. Spin for 15min at 15000rpm
7. Move supernatant to a new tube(leave back anyprecipitate)
8. Add 156  $\mu$ l(1/2volume of supernatant) isopropanol to precipitate genomic DNA at room temperature 30 min . Spin down DNA pellet (15000rpm 15min)and wash it with 1 ml 70%EtOH(air dry 5min)
9. DNA pellet is resuspended in 250  $\mu$ l TE buffer and added 140  $\mu$ l 10MNH<sub>4</sub>OAc
10. Add 1 vol of Phenol-Choloroform (390  $\mu$ l) and vortexshortly
11. Transfer supernatant (=350  $\mu$ l) to a new tube
12. Add 1 ml of 100% EtOH and mixwell
13. Spin for 5 min at 15000rpm
14. Wash the pellet with 1ml 70%EtOH
15. Spin for 5 min at 13000rpm
16. Dry out the pellet and resuspend the pellet in 40-50  $\mu$ l of TE